

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Mechthild RIEPING, et al.

GAU:

SERIAL NO: New Application

EXAMINER:

FILED: Herewith

FOR: PROCESS FOR THE FERMENTATIVE PREPARATION OF L-AMINO ACIDS USING STRAINS OF
THE ENTEROBACTERIACEAE FAMILY

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☒ Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e):
- | <u>Application No.</u> | <u>Date Filed</u> |
|------------------------|-------------------|
| 60/395,621 | July 15, 2002 |
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

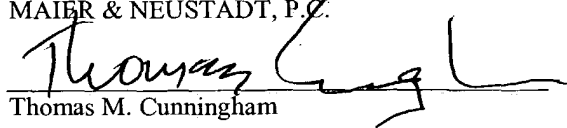
<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Germany	102 31 115.3	July 10, 2002

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.


Thomas M. Cunningham

Registration No. 45,394




22850

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

 **Aktenzeichen:** 102 31 115.3

Anmeldetag: 10. Juli 2002

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren
unter Verwendung von Stämmen der Familie
Enterobacteriaceae

IPC: C 12 N, C 12 P

 Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 20. Mai 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wallner

Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae

Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung
5 von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae, in denen das rseB-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der
10 Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, dass L-Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen der Enterobacteriaceae, insbesondere Escherichia coli (E. coli) und Serratia marcescens, hergestellt werden.
15 Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der
20 Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z.B. Ionenaustauschchromatographie, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser
25 Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. das Threonin-Analogon α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure (AHV) oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und
30 L-Aminosäuren wie z.B. L-Threonin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-Aminosäuren produzierender Stämme der Familie

Enterobacteriaceae eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Produktion untersucht. Zusammenfassende Informationen zur Zell- und Molekularbiologie von

- 5 Escherichia coli und Salmonella sind in Neidhardt (ed): Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology, 2nd edition, ASM Press, Washington, D.C., USA, zu finden.

Aufgabe der Erfindung

- 10 Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur
- 15 fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, die insbesondere bereits L-Aminosäuren produzieren, und in denen die für das rseB-Gen kodierende Nukleotidsequenz verstärkt wird.
- 20 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-
- 25 Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Threonin.

- Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität oder Konzentration eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in
- 30 einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym

bzw. Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Verstärkung, insbesondere Überexpression, wird die Aktivität oder Konzentration des
5 entsprechenden Proteins im allgemeinen um mindestens 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%, maximal bis 1000% oder 2000% bezogen auf die des Wildtyp-Proteins beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht.

10 Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte durchführt:

- 15 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen man das rseB-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert,
- b) Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen, und
- 20 c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder Anteilen (≥ 0 bis 100%) davon im Produkt verbleiben.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden
25 Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Laktose, Fructose, Maltose, Melasse, gegebenenfalls Stärke, gegebenenfalls Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es handelt sich um Vertreter der Familie Enterobacteriaceae, ausgewählt aus
30 den Gattungen Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia. Die Gattungen Escherichia und Serratia werden bevorzugt. Bei der Gattung Escherichia ist insbesondere die

Art *Escherichia coli* und bei der Gattung *Serratia* insbesondere die Art *Serratia marcescens* zu nennen.

Geeignete, insbesondere L-Threonin produzierende Stämme der Gattung *Escherichia*, insbesondere der Art *Escherichia coli* sind beispielsweise

- Escherichia coli TF427
- Escherichia coli H4578
- Escherichia coli KY10935
- Escherichia coli VNIIGenetika MG442
- 10 Escherichia coli VNIIGenetika M1
- Escherichia coli VNIIGenetika 472T23
- Escherichia coli BKIIM B-3996
- Escherichia coli kat 13
- Escherichia coli KCCM-10132.

15 Geeignete L-Threonin produzierende Stämme der Gattung *Serratia*, insbesondere der Art *Serratia marcescens* sind beispielsweise

- Serratia marcescens HNr21
- Serratia marcescens TLr156
- 20 Serratia marcescens T2000.

L-Threonin produzierende Stämme aus der Familie der Enterobacteriaceae besitzen bevorzugt, unter anderen, ein oder mehrere der genetischen bzw. phänotypischen Merkmale ausgewählt aus der Gruppe: Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure, Resistenz gegen Thialysin, Resistenz gegen Ethionin, Resistenz gegen α -Methylserin, Resistenz gegen Diaminobernsteinsäure, Resistenz gegen α -Aminobuttersäure, Resistenz gegen Borrelidin oder Cyclopentan-Carboxylsäure, Resistenz gegen Rifampicin, 25 Resistenz gegen Valin-Analoga wie beispielsweise Valinhydroxamat, Resistenz gegen Purinanaloga wie beispielsweise 6-Dimethylaminopurin, Bedürftigkeit für L-Methionin, gegebenenfalls partielle und kompensierbare

30

- Bedürftigkeit für L-Isoleucin, Bedürftigkeit für meso-Diaminopimelinsäure, Auxotrophie bezüglich Threonin-haltiger Dipeptide, Resistenz gegen L-Threonin oder Threonin-Raffinat, Resistenz gegen L-Homoserin, Resistenz
- 5 gegen L-Lysin, Resistenz gegen L-Methionin, Resistenz gegen L-Glutaminsäure, Resistenz gegen L-Aspartat, Resistenz gegen L-Leucin, Resistenz gegen L-Phenylalanin, Resistenz gegen L-Serin, Resistenz gegen L-Cystein, Resistenz gegen L-Valin, Empfindlichkeit gegenüber Fluoropyruvat, defekte
- 10 Threonin-Dehydrogenase, gegebenenfalls Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung, Verstärkung des Threonin-Operons, Verstärkung der Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I bevorzugt der feed back resistenten Form, Verstärkung der Homoserinkinase, Verstärkung der Threoninsynthase,
- 15 Verstärkung der Aspartatkinase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Synthase, Verstärkung
- 20 der Transhydrogenase, Verstärkung des RhtB-Genproduktes, Verstärkung des RhtC-Genproduktes, Verstärkung des YfiK-Genproduktes, Verstärkung einer Pyruvat-Carboxylase, und Abschwächung der Essigsäurebildung.

- Es wurde gefunden, dass Mikroorganismen der Familie
- 25 Enterobacteriaceae nach Verstärkung, insbesondere Überexpression des rseB-Gens, in verbesserter Weise L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin produzieren.

- Die Nukleotidsequenzen der Gene von Escherichia coli gehören zum Stand der Technik (Siehe nachfolgende
- 30 Textstellen) und können ebenfalls der von Blattner et al. (Science 277: 1453-1462 (1997)) publizierten Genomsequenz von Escherichia coli entnommen werden.

Das rseB-Gen wird unter anderem durch folgende Angaben beschrieben:

Bezeichnung: Regulator der sigma-E Faktor-Aktivität

Funktion: Regulation durch Interaktion mit der C-terminalen periplasmatischen Domäne des RseA-Proteins

- 5 Referenz: Missiakas et al.; Molecular Microbiology 24(2), 355-371 (1997); De Las Penas et al.; Molecular Microbiology 24(2): 373-385 (1997); Collinet et al.; Journal of Biological Chemistry 275(43): 33898-33904 (2000)

Accession No.: AE000343

Die Nukleinsäuresequenzen können den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI) der National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), der

- 15 Nukleotidsequenz-Datenbank der European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland bzw. Cambridge, UK) oder der DNA Datenbank von Japan (DDBJ, Mishima, Japan) entnommen werden.

Die in den angegebenen Textstellen beschriebenen Gene

- 20 können erfindungsgemäß verwendet werden. Weiterhin können Allele der Gene verwendet werden, die sich aus der Degeneriertheit des genetischen Codes oder durch funktionsneutrale Sinnmutationen („sense mutations“) ergeben. Die Verwendung endogener Gene wird bevorzugt.

- 25 Unter „endogenen Genen“ oder „endogenen Nukleotidsequenzen“ versteht man die in der Population einer Art vorhandenen Gene oder Allele beziehungsweise Nukleotidsequenzen.

Zur Erzielung einer Verstärkung können beispielsweise die Expression der Gene oder die katalytischen Eigenschaften

- 30 der Proteine erhöht werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die

- Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des
- 5 Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Threonin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert.
- 10 Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin
- 15 eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

- Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Chang und Cohen (Journal of Bacteriology 134: 1141-1156
- 20 (1978)), bei Hartley und Gregori (Gene 13: 347-353 (1981)), bei Amann und Brosius (Gene 40: 183-190 (1985)), bei de Broer et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80: 21-25 (1983)), bei LaVallie et al. (BIO/TECHNOLOGY 11: 187-193 (1993)), in
- 25 PCT/US97/13359, bei Llosa et al. (Plasmid 26: 222-224 (1991)), bei Quandt und Klipp (Gene 80: 161-169 (1989)), bei Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)) und in bekannten
- 30 Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

- In Enterobacteriaceae replizierbare Plasmidvektoren wie z.B. von pACYC184 abgeleitete Kloniervektoren (Bartolomé et al.; Gene 102: 75-78 (1991)), pTrc99A (Amann et al.; Gene 69: 301-315 (1988)) oder pSC101-Derivate (Vocke und Bastia;
- 35 Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80(21):

6557-6561 (1983)) können verwendet werden. In einem erfindungsgemäßen Verfahren kann man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzen, wobei der Plasmidvektor mindestens eine für das rseB-Gen kodierende 5 Nukleotidsequenz trägt.

Es ist ebenfalls möglich, Mutationen, die die Expression der jeweiligen Gene betreffen, durch Sequenzaustausch (Hamilton et al.; Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), Konjugation oder Transduktion in verschiedene 10 Stämme zu überführen.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin mit Stämmen der Familie Enterobacteriaceae vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des rseB-Gens, ein oder mehrere Enzyme des 15 bekannten Threonin-Biosyntheseweges oder Enzyme des anaplerotischen Stoffwechsels oder Enzyme für die Produktion von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat oder Enzyme der Glykolyse oder PTS-Enzyme oder Enzyme des Schwefelstoffwechsels zu verstärken. Die 20 Verwendung endogener Gene wird im allgemeinen bevorzugt.

So können beispielsweise gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon (US-A-4,278,765), 25
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen von Corynebacterium glutamicum (WO 99/18228),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen (Molecular and General Genetics 231(2): 332-336 30 (1992)),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen (Gene 31: 279-283 (1984)),

- die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB (European Journal of Biochemistry 158: 647-653 (1986)),
-
- 5 • das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB (EP-A-0 994 190),
 - das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (WO 02/06459),
 - das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC (EP-A-1 013 765),
- 10 • das für das Threoninexport-Protein kodierende thrE-Gen von Corynebacterium glutamicum (WO 01/92545),
 - das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen (Nucleic Acids Research 11: 5257-5266 (1983); Gene 23: 199-209 (1983)),
- 15 • das für das DNA-Bindeprotein HLP-II kodierende hns-Gen (Molecular and General Genetics 212: 199-202 (1988)),
 - das für die Phosphoglucomutase kodierende pgm-Gen (Journal of Bacteriology 176: 5847-5851 (1994)),
- 20 • das für die Fructose Biphosphat Aldolase kodierende fba-Gen (Biochemical Journal 257: 529-534 (1989)),
 - das für die Phosphohistidin-Protein-Hexose-Phosphotransferase des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende ptsH-Gen des ptsHIcrr-Operons (Journal of Biological Chemistry 262: 16241-16253 (1987)),
- 25 • das für das Enzym I des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende ptsI-Gen des ptsHIcrr-Operons (Journal of Biological Chemistry 262: 16241-16253 (1987)),
 - das für die Glucose-spezifische IIA Komponente des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende crr-Gen des

ptsHIcrr-Operons (Journal of Biological Chemistry 262: 16241-16253 (1987)),

- das für die Glucose-spezifische IIBC Komponente kodierende ptsG-Gen (Journal of Biological Chemistry 5 261: 16398-16403 (1986)),
- das für den Regulator des Leucin-Regulons kodierende lrp-Gen (Journal of Biological Chemistry 266: 10768-10774 (1991)),
- das für den globalen Regulator Csr kodierende csrA-Gen 10 (Journal of Bacteriology 175: 4744-4755 (1993)),
- das für den Regulator des fad-Regulons kodierende fadR-Gen (Nucleic Acids Research 16: 7995-8009 (1988)),
- das für den Regulator des zentralen Intermediärstoffwechsels kodierende iclR-Gen (Journal of 15 Bacteriology 172: 2642-2649 (1990)),
- das für das 10 Kd Chaperon kodierende mopB-Gen (Journal of Biological Chemistry 261: 12414-12419 (1986)), das auch unter der Bezeichnung groES bekannt ist,
- das für die kleine Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpC-Gen des ahpCF-Operons 20 (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92: 7617-7621 (1995)),
- das für die große Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpF-Gen des ahpCF-Operons 25 (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92: 7617-7621 (1995)),
- das für die Cystein-Synthase A kodierende cysK-Gen (Journal of Bacteriology 170: 3150-3157 (1988)),

- das für den Regulator des cys-Regulons kodierende cysB-Gen (Journal of Biological Chemistry 262: 5999-6005 (1987)),
- das für das Flavoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysJ-Gen des cysJIH-Operons (Journal of Biological Chemistry 264: 15796-15808 (1989), Journal of Biological Chemistry 264: 15726-15737 (1989)),
- das für das Hämoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysI-Gen des cysJIH-Operons (Journal of Biological Chemistry 264: 15796-15808 (1989), Journal of Biological Chemistry 264: 15726-15737 (1989)),
- das für die Adenylylsulfat-Reduktase kodierende cysH-Gen des cysJIH-Operons (Journal of Biological Chemistry 264: 15796-15808 (1989), Journal of Biological Chemistry 264: 15726-15737 (1989)),
- das für ein Membranprotein mit anti-sigmaE-Aktivität kodierende rseA-Gen des rseABC-Operons (Molecular Microbiology 24 (2): 355-371 (1997)),
- das für die Decarboxylase Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucA-Gen des sucABCD-Operons (European Journal of Biochemistry 141 (2): 351-359 (1984)),
- das für die Dihydrolipoyltranssuccinase E2 Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucB-Gen des sucABCD-Operons (European Journal of Biochemistry 141 (2): 361-374 (1984)),
- das für die β -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucC-Gen des suc ABCD-Operons (Biochemistry 24 (22): 6245-6252 (1985)),

- das für die α -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucD-Gen des sucABCD-Operons (Biochemistry 24 (22): 6245-6252 (1985)), und
 - das für die Aldehyd-Dehydrogenase (E.C. 1.2.1.3)
- 5 kodierende aldH-Gen (Gene 99(1): 15-23 (1991)),

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des rseB-Gens, eines oder mehrere der Gene

10 ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen (Journal of Bacteriology 169: 4716-4721 (1987)),
 - das für die Malat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37) kodierende mdh-Gen (Archives in Microbiology 149: 36-42
- 15 (1987)),
- das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfa (Accession Number AAC77180 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), WO 02/29080),
 - das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP (Accession Number AAC77179 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA),
- 20 WO 02/29080),
- das für das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
- 25 kodierende pckA-Gen (WO 02/29080),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen (WO 02/36797),

das für das Enzym Isocitrat-Lyase kodierende aceA-Gen (Journal of Bacteriology 170: 4528-4536 (1988)),

das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen (Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 59: 256-251 (1995)), das auch unter der Bezeichnung mlc-Gen bekannt ist,

- 5 • das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen (Molecular and General Genetics 226: 332-336 (1991)), das auch unter der Bezeichnung cra-Gen bekannt ist,
- das für den Sigma³⁸-Faktor kodierende rpoS-Gen (WO 01/05939), das auch unter der Bezeichnung katF-Gen
- 10 bekannt ist, und
- das für die Aspartat Ammonium-Lyase kodierende aspA-Gen (Nucleic Acids Research 13(6): 2063-2074 (1985)),

abzuschwächen, insbesondere auszuschalten oder die Expression zu verringern.

- 15 Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität oder Konzentration eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man
- 20 beispielsweise einen schwachen Promotor oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Enzym (Protein) oder Gen inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.
- 25 Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10% oder 0 bis 5% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-Proteins, beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration
- 30 des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur

Verstärkung des rseB-Gens, unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, 5 UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können im batch - Verfahren (Satzkultivierung), im fed batch (Zulaufverfahren) oder im repeated fed batch-Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) kultiviert werden. Eine
10 Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag,
15 Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for
20 General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Laktose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und gegebenenfalls Cellulose, Öle und Fette
25 wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet
30 werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat,

Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure,

- 5 Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können
- 10 essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder
- 15 in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Die Fermentation wird im allgemeinen bei einem pH-Wert von 5,5 bis 9,0, insbesondere 6,0 bis 8,0, durchgeführt. Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie

- 20 Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur
- 25 Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur
- 30 eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 25°C bis 45°C und vorzugsweise bei 30°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-Aminosäuren bzw. L-Threonin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden
- 35 erreicht.

Die Analyse von L-Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958))

5 beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, wie beispielsweise L-
10 Threonin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Methionin, L-Homoserin und L-Lysin, insbesondere L-Threonin.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren,
insbesondere L-Threonin, dadurch gekennzeichnet, dass
man folgende Schritte durchführt:
 - 5 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
produzierenden Mikroorganismen der Familie
Enterobacteriaceae, in denen man das rseB-Gen oder
dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt,
insbesondere überexprimiert,
 - 10 b) Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium
oder in den Zellen der Mikroorganismen, und
 - c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure wobei
gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe
und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder
15 Anteilen (≥ 0 bis 100%) davon im Produkt
verbleiben.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass man Mikroorganismen einsetzt, in denen man
zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der
20 gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass man Mikroorganismen einsetzt, in denen die
Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet
sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure
25 verringern.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass man die Expression des (der) Polynukleotids (e),
das (die) für das rseB-Gen kodiert (kodieren), erhöht.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
30 dass man die regulatorischen und/oder katalytischen

Eigenschaften des Polypeptids (Proteins) verbessert oder erhöht, für das das Polynukleotid rseB kodiert.

6. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Herstellung von L-Aminosäuren
- 5 Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:
- 6.1 das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die
- 10 Threoninsynthese kodierende thrABC-Operon,
- 6.2 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen,
- 6.3 das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen,
- 15 6.4 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen,
- 6.5 die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB,
- 6.6 das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB,
- 20 6.7 das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen,
- 6.8 das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC,
- 6.9 das für das Threoninexport-Protein kodierende thrE-Gen,
- 25 6.10 das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen,
- 6.11 das für das DNA-Bindeprotein HLP-II kodierende hns-Gen,

- 6.12 das für die Phosphoglucomutase kodierende pgm-Gen,
- 6.13 das für die Fructose Biphosphat Aldolase kodierende fba-Gen,
- 5 6.14 das für die Phosphohistidin-Protein-Hexose-Phosphotransferase kodierende ptsH-Gen,
- 6.15 das für das Enzym I des Phosphotransferase-Systems kodierende ptsI-Gen,
- 10 6.16 das für die Glucose-spezifische IIA Komponente kodierende crr-Gen,
- 6.17 das für die Glucose-spezifische IIBC Komponente kodierende ptsG-Gen,
- 6.18 das für den Regulator des Leucin-Regulons kodierende lrp-Gen,
- 15 6.19 das für den globalen Regulator Csr kodierende csrA-Gen,
- 6.20 das für den Regulator des fad-Regulons kodierende fadR-Gen,
- 20 6.21 das für den Regulator des zentralen Intermediärstoffwechsels kodierende iclR-Gen,
- 6.22 das für das 10 Kd Chaperon kodierende mopB-Gen,
- 6.23 das für die kleine Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpC-Gen,
- 25 6.24 das für die große Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpF-Gen,
- 6.25 das für die Cystein-Synthase A kodierende cysK-Gen,

- 6.26 das für den Regulator des cys-Regulons
kodierende cysB-Gen,
- 6.27 das für das Flavoprotein der NADPH-Sulfit-
Reduktase kodierende cysJ-Gen,
- 5 6.28 das für das Hämoprotein der NADPH-Sulfit-
Reduktase kodierende cysI-Gen,
- 6.29 das für die Adenylylsulfat-Reduktase kodierende
cysH-Gen,
- 10 6.30 das für ein Membranprotein, das als negativer
Regulator auf die sigmaE-Aktivität wirkt,
kodierende rseA-Gen,
- 6.31 das für die Decarboxylase Untereinheit der 2-
Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucA-Gen,
- 15 6.32 das für die Dihydrolipoyltranssuccinase E2
Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase
kodierende sucB-Gen,
- 6.33 das für die β -Untereinheit der Succinyl-CoA
Synthetase kodierende sucC-Gen,
- 20 6.34 das für die α -Untereinheit der Succinyl-CoA
Synthetase kodierende sucD-Gen, und
- 6.35 das für die Aldehyd-Dehydrogenase kodierende
aldH-Gen,

verstärkt, insbesondere überexprimiert.

- 25 7. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass man zur Herstellung von L-Aminosäuren
Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae
fermentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines
oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:

- 7.1 das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen,
- 7.2 das für die Malat-Dehydrogenase kodierende mdh-Gen,
- 5 7.3 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfA,
- 7.4 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP,
- 10 7.5 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pckA-Gen,
- 7.6 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen,
- 7.7 das für die Isocitrat-Lyase kodierende aceA-Gen,
- 15 7.8 das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen,
- 7.9 das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen,
- 20 7.10 das für den Sigma³⁸-Faktor kodierende rpoS-Gen, und
- 7.11 das für die Aspartat Ammonium-Lyase kodierende aspA-Gen,

abschwächt, insbesondere ausschaltet oder die Expression verringert.

- 25 8. Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, insbesondere der Gattung Escherichia, in denen das rseB-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert, vorliegt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, in dem man folgende Schritte durchführt:

- 5 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen man das rseB-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert,
- 10 b) Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure